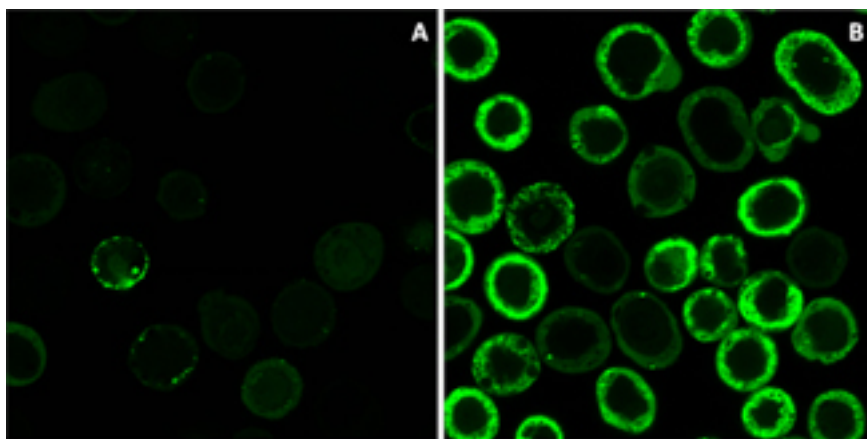


Xaperones bacterianes per millorar la producció de proteïnes a cèl·lules d'insecte

02/2010 - Biologia. La possibilitat d'obtenir proteïnes amb aplicacions industrials o terapèutiques mitjançant la tecnologia del DNA recombinant ha revolucionat la indústria biotecnològica. Malgrat això, la producció de proteïnes recombinants en sistemes heteròlegs encara no està optimitzada, i moltes vegades aquestes proteïnes s'obtenen en forma insoluble. La selecció d'un sistema d'expressió adequat és important per aconseguir obtenir la proteïna en una forma funcional i soluble. En aquesta tesi s'ha utilitzat una GFP recombinant com a proteïna model per a estudiar l'agregació i activitat durant la producció de proteïnes recombinants en *Escherichia coli* i en el sistema d'expressió de baculovirus.



Imatges de microscòpia confocal de cèl·lules d'insecte en cultiu infectades amb un baculovirus que produeix una GFP recombinant. A) Producció de GFP en absència de xaperones bacterianes. B) Producció de GFP en presència de les xaperones bacterianes DnaK i DnaJ.

Al produir la nostra proteïna model en *E. coli*, aquesta s'obté majoritàriament en forma de cossos d'inclusió amb una elevada activitat biològica. Els nostres resultats indiquen que encara que és possible millorar la solubilitat de la proteïna optimitzant paràmetres del procés de producció, les condicions que permeten millorar els nivells de producció resulten en una disminució de la qualitat conformacional de la proteïna obtinguda. Ja que no és possible maximitzar al mateix temps el rendiment del procés de producció i la qualitat de la proteïna obtinguda, el disseny del procés haurà d'optimitzar-se en funció del paràmetre més rellevant per a l'ús final de la proteïna.

A més, la versió soluble d'aquesta proteïna conté una àmplia gamma d'agregats solubles, que conformen una població heterogènia quant a estructura secundària i funcionalitat. Això indica que els cossos d'inclusió, que són més homogenis que la seva versió soluble, poden entendre's com una petita subpoblació dintre del total d'espècies proteïques recombinants. Per altra banda, la qualitat de la proteïna recombinant representa un terme mitjà estadístic de la qualitat de cadascuna d'aquestes espècies.

Una de les estratègies més utilitzades per a millorar la solubilitat de proteïnes recombinants consisteix en la coexpressió de moduladores del plegament. Al coexpressar la xaperona bacteriana DnaK i la seva coxaperona DnaJ amb la nostra GFP model produïda en *E. coli*, vam observar una disminució de l'agregació, que estava associada a proteòlisis. El canvi d'hoste d'aquestes xaperones juntament amb la nostra proteïna model per a produir-les en el sistema d'expressió de baculovirus en cèl·lules d'insecte o larves va permetre mantenir l'activitat foldasa de DnaKJ eliminant la seva activitat proteolítica associada, ja que aquesta és depenent de proteases bacterianes. En el sistema d'expressió de baculovirus vam observar millores en els nivells de proteïna total i soluble, l'estabilitat proteolítica, solubilitat i activitat biològica al ser coexpressada amb les xaperones bacterianes DnaKJ. A més, hem pogut confirmar en un sistema eucariota el concepte que el rendiment i la qualitat de la proteïna obtinguda són paràmetres antagònics que no es poden afavorir de forma simultània en processos de producció.

Finalment, també hem pogut comprovar que les xaperones bacterianes són funcionals en un sistema eucariota. Això permet ampliar el catàleg de moduladors del plegament disponibles per al seu ús en sistemes eucariotes.

Mònica Martínez Alonso

Departament de Genètica i de Microbiologia

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB) CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)

"Engineering and Production of Quality Viral Proteins in Prokaryotic and Eukaryotic Systems". Tesi doctoral defensada per Mònica Martínez Alonso el 16 de febrer a las 12:00h, a la Sala de Graus de la Facultat de Biociències.